VERLUST VON HETEROCHROMATISCHEN CHROMOSOMENABSCHNITTEN IN EINER ANEUPLOIDEN GEWEBEKULTUR VON MICROTUS AGRESTIS

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
zu Bonn

vorgelegt von
VERENA FIRSCHING
aus Bochum

Bonn 1976

VERLUST VON HETEROCHROMATISCHEN CHROMOSOMENABSCHNITTEN IN EINER ANEUPLOIDEN GEWEBEKULTUR VON MICROTUS AGRESTIS

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
zu Bonn

vorgelegt von
VERENA FIRSCHING
aus Bochum

Bonn 1976

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. F. Pera
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Weicker

Tag der mündlichen Prüfung: 24.2.1976

Aus dem Anatomischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Abteilung für Experimentelle Biologie
Leiter: Professor Dr. Wartenberg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: Richard Schwarzbold, 5305 Witterschlick b. Bonn

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
EINLEITUNG		5
MATERIAL UND METHODEN		7
1.	Gewebekultur	7
2.	Chromosomenpräparate	7
3.	Autoradiographie	8
4.	Färbung des konstitutiven Heterochromatins	8
ERGEBNISSE		10
1.	Zahl und Struktur der Chromosomen zu verschiedenen Kulturzeiten	10
1.1.	Diploide Phase	10
1.2.	Aneuploide Phase	11
1.2.1.	Chromosomenzahlen	12
1.2.2.	Markerchromosomen	14
1.2.2.1.	Morphologie	14
1.2.2.2.	Häufigkeiten	15
2.	Lokalisation des konstitutiven Heterochromatins	19
2.1.	Spätreplikationsmuster	20
2.2.	Färbung des konstitutiven Heterochromatins	20
3.	Länge der heterochromatischen Chromosomenabschnitte in diploiden und aneuploiden Zellen	23
DISKUSSION		26
1.	Heterochromatin	26
1.1.	Definition	26
1.2.	Fakultatives und konstitutives Heterochromatin bei Microtus agrestis	27

Seite

1.3.	Molekularer Aufbau des Heterochromatins	30
1.4.	Mögliche Funktionen des konstitutiven Heterochromatins	35
1.4.1.	Folgerungen aus der späten DNS-Synthese	35
1.4.2.	Folgerungen aus dem hetero-pyknotischen Verhalten	35
1.4.3.	Folgerungen aus dem Aufbau aus hochrepetitiver DNS	38
2.	Zeichen der Entartung der Zellen	39
2.1.	Numerische Aberration	39
2.2.	Morphologische Aberration	39
2.3.	Verlust des konstitutiven Hetero-chromatins der Geschlechts-chromosomen	40
3.	"Gesteigerte Heterochromatisierung als pathogenetisches Prinzip" (nach HARBERS und SANDRITTER, 1968)	42
4.	Aufgabe des Heterochromatins im Individuum und in der Evolution	45
ZUSAMMENFASSUNG		47
LITERATUR		49
DANKSAGUNG		60
LEBENSLAUF		61

EINLEITUNG

Die Teilungsfähigkeit somatischer Zellen ist nicht unbegrenzt; für den Menschen und für Säuger ganz allgemein werden etwa 50 Zellgenerationen angegeben (Lit. bei SCHWARZACHER, 1974). Danach ist sowohl im lebenden Organismus wie auch in der Gewebekultur die Zellvermehrung beendet. Die Lebensdauer von Zellen in der Gewebekultur ist dabei um so kürzer, je älter das Individuum zum Zeitpunkt der Zellentnahme war, d. h. je größer die Zahl der bereits abgelaufenen Zellteilungen war und je kürzer die Dauer des Zellzyklus bei der untersuchten Spezies ist. Der Zellzyklus von Säugerzellen dauert in vitro zwischen 10 und 24 Stunden. Bei gleichmäßiger Vermehrung aller Zellen ist somit das Zellwachstum nach etwa 1 bis 2 Monaten beendet (PERA, FIRSCHING und SCHOLZ, 1974).

Es gibt jedoch Zellkulturen, die weit länger als 2 Monate lebensfähig sind, die sich jahrelang züchten und nahezu beliebig vermehren lassen. Chromosomenanalysen haben jedoch gezeigt, daß in den Zellen dieser Langzeitkulturen stets mehr oder weniger auffällige Chromosomenaberrationen vorlagen (PERA et al., 1974).

In dieser Arbeit wird über Untersuchungen an einer Langzeitkultur einer männlichen Erdmaus (Microtus agrestis) berichtet, bei der in bestimmten Abständen Chromosomenanalysen durchgeführt wurden, um die Veränderungen des ursprünglich normalen Chromosomensatzes zu verfolgen.

Von allen bekannten Säugern hat M. agrestis die größten Geschlechtschromosomen: das X macht etwa 20 % des haploiden Satzes aus, der entsprechende Wert für das X-Chromosom des Menschen ist etwa 5 % (WOLF, FLINSPACH,

BÖHM und OHNO, 1965). Die Geschlechtschromosomen der Erdmaus sind zum überwiegenden Teil heterochromatisch; die Autosomen besitzen nur kleine heterochromatische Segmente in der Centromerregion (WOLF et al., 1965; SCHMID, SMITH und THEILER, 1965; ARRIGHI, HSU, SAUNDERS und SAUNDERS, 1970; PERA, 1972a; COOPER und HSU, 1972). Im weiblichen Geschlecht bestehen die kurzen Arme des einen X-Chromosoms aus Euchromatin, die des zweiten X aus fakultativem Heterochromatin, die langen Arme beider X-Chromosomen aus konstitutivem Heterochromatin; beim Männchen ist das Y fast vollständig, das X zu 3/4 aus konstitutivem Heterochromatin aufgebaut (WOLF et al., 1965; SCHMID et al., 1965). Da das Heterochromatin somit in großen, zusammenhängenden Blöcken auf nur wenigen Chromosomen lokalisiert ist, können mögliche Veränderungen dieses Chromosomenmaterials leicht erkannt werden.

In der vorliegenden Arbeit interessierte besonders die Beantwortung folgender Fragen:

1. Welche Veränderungen an den Chromosomen lassen sich im Verlauf der Kulturzeit beobachten, treten sie plötzlich auf oder nehmen sie mit der Zeit zu?

2. Ist die Lebensdauer der untersuchten Kultur wie bei euploiden Kulturen begrenzt, beeinträchtigt der Verlust eines großen Teils des Heterochromatins die Lebensfähigkeit der Zellen, oder vermehren sich die Zellen auch über die 50-Generationen-Grenze hinaus weiter?

MATERIAL UND METHODEN

1. Gewebekultur

Aus der Bauchhaut einer männlichen Erdmaus (Microtus agrestis) wurden im Histologischen-Embryologischen Institut der Universität Wien (Direktor: Prof. Dr. H.G. Schwarzacher) Haut-Bindegewebskulturen angesetzt. Gewebsstückchen wurden nach der Plasmamethode (LEJEUNE, GAUTIER und TURPIN, 1959; HARNDEN, 1960) auf dem Boden von Kulturflaschen angesetzt. Nach dem Koagulieren des Plasmas wurde Kulturmedium zugesetzt. Während der ersten 35 Passagen in Wien wurde als Kulturmedium ein Gemisch aus 20 Teilen menschlichem Nabelschnurserum, 10 Teilen Embryoextrakt, 50 Teilen Parker 199 und 20 Teilen Gey'scher Lösung verwendet; Antibiotica wurden dabei nicht zugesetzt. Die Kultur zeigte anfangs ein sehr langsames Wachstum, so daß die erste Subkultur erst nach 4 Wochen angelegt werden konnte. Nach 7 Monaten wurde die Kultur im Anatomischen Institut der Universität Bonn weitergezüchtet; hier wurde als Kulturmedium TC MEM Eagle mit 20 % fetalem Kälberserum, Glutamin, Penicillin-Streptomycin und Phenolrot benützt. Innerhalb der nächsten 4 Monate konnten noch etwa 30 Subkulturen gewonnen werden, bevor die Kultur abgebrochen wurde.

2. Chromosomenpräparate

Gut bewachsene, mitosereiche Zellkulturen wurden mit ^{3}H-Thymidin (Thymidin-methyl-^{3}H, 1 µc/ml Kulturmedium; NEN, Dreieichenhain) markiert. Nach 2 Stunden wurde dem Kulturmedium 0,3 µg Colcemid/ml (Geigy, Basel) zugegeben. 3 Stunden später wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert und mit hypotonischer

Lösung behandelt (Hanks - A. dest. 1 : 4; 30 min). Die Chromosomenpräparate wurden durch Auftropfen der Zellen auf in Eiswasser getauchte Objektträger und raschem Trocknen an der Luft hergestellt und entweder ungefärbt der Autoradiographie zugeführt oder mit Giemsa bzw. Diamantfuchsin gefärbt.

3. Autoradiographie

Die markierten Präparate wurden mit Stripping Film (Kodak AR 10) überzogen und zwischen 10 und 60 Tagen exponiert, dann entwickelt und fixiert. Die Zellen wurden entweder vor der Autoradiographie mit Diamantfuchsin (Hydrolyse in 1 n HCL 60° C 8 min, 0,1 % Diamantfuchsin 20 min, spülen in A. dest., lufttrocknen, oder nach der Autoradiographie mit Pararosanilin-Methylgrün (PERA und WOLF, 1967) gefärbt. Nach Auswertung der Autoradiographien wurden nach der von BIANCHI, LIMA-DE-FARIA und JAWORSKA (1964) angegebenen Methode die Silberkörner entfernt und die Zellen, falls erforderlich, mit Diamantfuchsin nachgefärbt.

4. Färbung des konstitutiven Heterochromatins

In Anlehnung an die von ARRIGHI et al. (1970) und YUNIS, ROLDAN, YASMINEH und LEE (1971) angegebenen Methoden zur Darstellung des konstitutiven Heterochromatins wurden Chromosomenpräparate folgender Behandlung unterworfen (siehe auch PERA, 1972a): 0,1 x SSC, 92° C, 3 min, ("2 x SSC" : 0,3 M NaCl und 0,03 M Na-Citrat; 0,1 x SSC: 5 Teile 2 x SSC auf 95 Teile A. dest.); eintauchen in eiskaltes 0,1 x SSC; entwässern in 70 und 96 %igem sowie absolutem Alkohol, lufttrocknen;

2 x SSC, 65° C, 18 Std., Giemsafärbung (10 ml der konzentrierten alkoholischen Lösung (Merck, Darmstadt) auf 90 ml Phosphatpuffer pH 6,8). Die Färbedauer betrug ungefähr 20 min, der Färbeeffekt wurde mikroskopisch kontrolliert. Dann wurden die Präparate kurz in Leitungswasser gespült, luftgetrocknet und in DePeX eingebettet.

ERGEBNISSE

1. Zahl und Struktur der Chromosomen zu verschiedenen Kulturzeiten

1.1. Diploide Phase

In den ersten sechs Subkulturen (bis zum 31. Tag) der Fibroblastenkultur waren fast ausschließlich diploide Mitosen zu beobachten; 1 % der Mitosen waren tetraploid.

Die diploiden Mitosen zeigten die für M. agrestis typische Chromosomenzahl von 50 (Abb. 1a); morphologisch sind außer den großen Geschlechtschromosomen die Autosomen Nr. 1 (großes, akrozentrisches Chromosom) und Nr. 24 (kleines, metazentrisches Chromosom) erkennbar. Die übrigen Autosomen sind akrozentrisch; ihre geringen Größenunterschiede erlauben keine eindeutige Identifizierung.

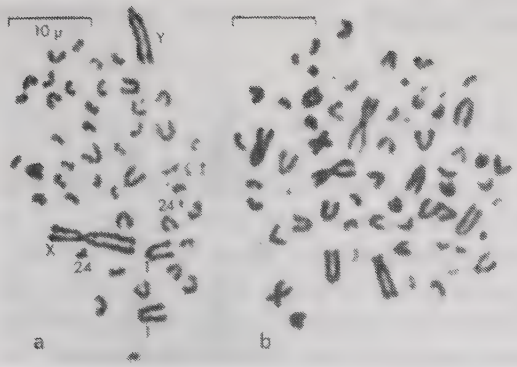

Abb. 1 a und b: Metaphaseplatten aus der 6. (a) und der 35. (b) Passage einer Gewebekultur von Microtus agrestis (♂). Giemsafärbung. a diploide Mitose mit 50 Chromosomen; die morphologisch unterscheidbaren Chromosomen X, Y, Nr. 1 und Nr. 24 sind bezeichnet. b aneuploide Mitose mit 62 Chromosomen und einigen kleinen Chromosomenfragmenten.

1.2. Aneuploide Phase

Von der 16. Subkultur (94. Tag) an waren Zellen zu beobachten, deren Karyotyp auf den ersten Blick wenig Ähnlichkeit mit M. agrestis-Zellen zeigte (Abb. 1 b). Besonders auffällig war das Fehlen der großen Geschlechtschromosomen und das Vorkommen von größeren metazentrischen und abnorm großen akrozentrischen Chromosomen. Normale diploide M. agrestis-Mitosen wurden in diesen Subkulturen nur mehr selten gefunden (weniger als 1 %). Die Kultur wuchs zu diesem Zeitpunkt

ausgesprochen rasch; nähere Untersuchungen über die Proliferationsrate wurden jedoch nicht durchgeführt.

1.2.1. Chromosomenzahlen

An vier verschiedenen Subkulturen wurden Chromosomenanalysen durchgeführt. Die Subkultur Nr. 35 wurde am 181. Tag verarbeitet, die Subkultur Nr. 38 am 200. Tag, Nr. 42 am 219. Tag und Nr. 46 am 259. Tag. Von jeder dieser Kulturen wurden 100 mit Giemsa gefärbte Mitosen photographiert und nach der Chromosomenzahl und dem Auftreten von abnormen Chromosomen ausgewertet. Das einzige Kriterium für die Auswahl der Mitosen war eine gute Chromosomenstreuung.

Die Chromosomenzahlen zeigten in allen untersuchten Kulturen eine große Streubreite (Abb. 2). In Subkultur Nr. 35 trat je ein Gipfel im diploiden Bereich mit Chromosomenzahlen um 45 und im tetraploiden Bereich mit 80 bis 90 Chromosomen auf. Vereinzelt fanden sich auch Mitosen mit höheren Chromosomenzahlen (bis 160). In Subkultur Nr. 38 war der 2. Gipfel vom tetraploiden in den triploiden Bereich (75 Chromosomen) verschoben. Die relativ scharfe Trennung zwischen diploid und polyploid, wie sie in den ersten beiden Kulturen zu beobachten war, verschwand in den folgenden Kulturen. In Subkultur Nr. 42 wurden gehäuft Mitosen im triploiden Bereich gefunden; Nr. 46 zeigte keine Bevorzugung einer bestimmten Ploidieklasse.

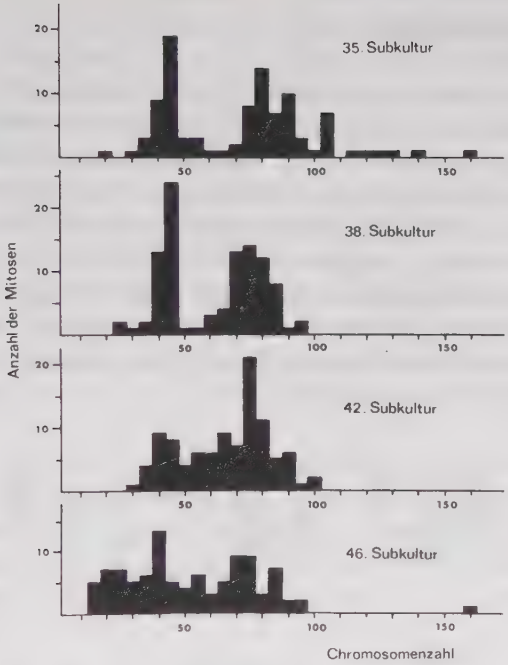

Abb. 2: Häufigkeitsverteilung der Chromosomenzahlen von je 100 Mitosen aus vier Subkulturen einer aneuploiden Gewebekultur von Microtus agrestis (♂).

1.2.2. Markerchromosomen

1.2.2.1. Morphologie

Die von typischen M. agrestis-Chromosomen morphologisch abweichenden Chromosomen wurden als Markerchromosomen bezeichnet. Es ließen sich fünf verschiedene Markerchromosomen unterscheiden (Abb. 3 a - e). Als Markerchromosom a wurde ein großes submetazentrisches Chromosom bezeichnet, Markerchromosom b ist groß und annähernd metazentrisch, c groß und akrozentrisch (größer als das normale Autosom Nr. 1), d mittelgroß, metazentrisch und e klein, metazentrisch (aber nicht so klein wie das normale Autosom Nr. 24).

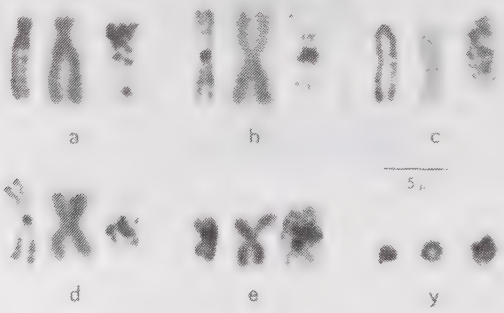

Abb. 3 a-e und y: Markerchromosomen a bis e und Y-Fragment (y) der aneuploiden Zellen einer Gewebekultur von M. agrestis (♂). Darstellung des konstitutiven Heterochromatins (rechts) und des Spätreplikationsmusters nach Markierung mit ^{3}H-Thymidim (Mitte: nach Entfernung der Silberkörner, Diamantfuchsin; rechts: nach Autoradiographie, Pararosanilin-Methylgrün).

1.2.2.2. Häufigkeiten

Auf Grund der starken Streuung der Chromosomenzahlen in den untersuchten Gewebekulturen dieses Falles stellte sich die Frage: betrifft die Vermehrung oder Verminderung der Chromosomenzahl über oder unter die euploide Norm gleichmäßig alle Chromosomen oder sind bestimmte Chromosomen, z. B. die als einzige identifizierbaren Markerchromosomen, bevorzugt von numerischen Aberrationen betroffen?

Die Markerchromosomen ließen sich in allen untersuchten Subkulturen der aneuploiden Phase nachweisen. Ihre Häufigkeiten wiesen jedoch eine beträchtliche Streubreite auf.

So wurden die Markerchromosomen a, b und c in fast allen Mitosen unabhängig von deren Gesamt-Chromosomenzahl gefunden, während das Markerchromosom d einigen diploiden und hypodiploiden Mitosen und Markerchromosom e vielen Mitosen, auch des tetraploiden Bereichs, fehlten (vgl. Abb. 4).

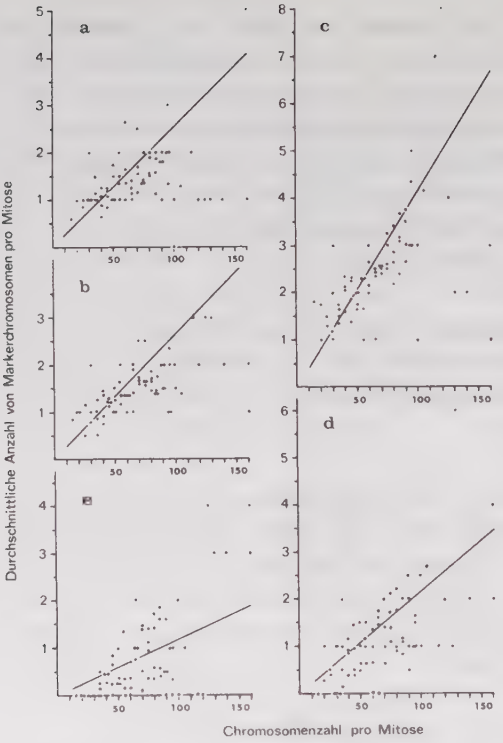

Abb. 4: Beziehung zwischen der durchschnittlichen Anzahl der Markerchromosomen a bis e und der Chromosomenzahl pro Mitose.

Die Zahl der Markerchromosomen wurde in Beziehung zur Chromosomenzahl der Mitosen gesetzt. Hierzu wurden von insgesamt 400 analysierten Mitosen die Gesamtchromosomenzahlen in Klassen zu je 5 Chromosomen eingeteilt und jeder Klasse die Anzahl der gefundenen Markerchromosomen zugeordnet. Für jede Ploidieklasse wurde der Mittelwert der Häufigkeit der Markerchromosomen gebildet.

Die durchschnittliche Anzahl der fünf Markerchromosomen pro Klasse ist in Abb. 4 graphisch dargestellt.

Für den diploiden Bereich (Chromosomenzahlen zwischen 35 und 55) und den tetraploiden Bereich (80 bis 100 Chromosomen) gibt Tab. 1 genauere Angaben über Mittelwerte und Standardabweichung der Häufigkeit der Markerchromosomen. Der Vergleich zwischen diploiden und tetraploiden Zellen zeigt, daß die Mittelwerte der Markerchromosomen-Häufigkeit in tetraploiden Zellen kleiner ist als der (erwartete) doppelte Mittelwert von diploiden Zellen. Ausgehend vom errechneten Mittelwert im diploiden Bereich wurde für jedes Markerchromosom die Erwartungshäufigkeit für andere Ploidieklassen gebildet (in Abb. 4 durch eine durchgezogene Linie dargestellt). Bei allen Markerchromosomen liegen, wie Abb. 4 zeigt, etwa doppelt so viele Mittelwerte unter den Erwartungswerten wie darüber. Dies bedeutet, daß die Chromosomenvermehrung in polyploiden Zellen hauptsächlich durch Zunahme anderer Chromosomen als der Markerchromosomen erfolgt ist. Polyploide Zellen dieser Kultur sind also wahrscheinlich nicht durch einfache Verdoppelung der Chromosomenzahl, sondern durch inäquale Zellteilungen entstanden. Hierdurch läßt sich auch die große Standardabweichung der Mittelwerte erklären.

Trotz der erheblichen Streubreite der Häufigkeiten sind doch deutliche Unterschiede in den Mittelwerten der verschiedenen Markerchromosomen zu beobachten (Tab. 1). In Mitosen mit diploiden Chromosomenzahlen treten die Markerchromosomen a, b und d im Durchschnitt je einmal auf; für das Markerchromosom c liegt der Durchschnitt nahe bei 2 und für das Markerchromosom e bei 0,5. Unter der Annahme, daß die Entstehung eines bestimmten Markerchromosoms nicht gleichzeitig in

Tabelle 1: Durchschnittliche Anzahl der Markerchromosomen a - e in diploiden und tetraploiden Mitosen aus 4 verschiedenen Subkulturen

Markerchromosomen	Zahl der Markerchromosomen a	b	c	d	e	Zahl der Mitosen
diploid (n=35-55)						
Subkultur Nr.						
35	0.99 ± 0.06	1.06 ± 0.22	1.99 ± 0.47	1.05 ± 0.40	0.59 ± 0,51	37
38	1.38 ± 0.39	1.25 ± 0.56	1.76 ± 0.51	0.86 ± 0.21	0.52 ± 0.36	41
42	1.27 ± 0.22	1.22 ± 0.08	1.83 ± 0.17	1.28 ± 0.58	0.78 ± 1.24	31
46	1.13 ± 0.49	1.22 ± 0.36	1.80 ± 0.36	0.52 ± 0.38	0.19 ± 0.12	34
Mittelwert/ Summe	1.19 ± 0.33	1.19 ± 0.33	1.85 ± 0.38	0.93 ± 0.48	0.52 ± 0.68	143
tetraploid (n=80-100)						
Subkultur Nr.						
35	1.33 ± 0.78	1.89 ± 0.34	3,52 ± 0.60	2.07 ± 0.65	1.10 ± 0.86	35
38	1.68 ± 0.92	1.90 ± 0.13	3.13 ± 0.19	1.47 ± 0.48	1.01 ± 0.72	23
42	1.67 ± 0.40	1.37 ± 0.21	2.65 ± 1.46	1.24 ± 0.71	0.89 ± 0.66	25
46	1.96 ± 0.07	1.40 ± 0.28	3.08 ± 0.35	1.04 ± 0.41	0.35 ± 0.25	14
Mittelwert/ Summe	1.64 ± 0.62	1.64 ± 0.35	3.09 ± 0.85	1.48 ± 0.68	0.85 ± 0.68	97

mehreren Zellen, sondern als einmaliges Ereignis in einer einzelnen Zelle stattgefunden hat, deren Tochterzellen dann durch erhöhte Proliferationsfähigkeit die anderen Zellen der Kultur verdrängen konnten, lassen die Mittelwerte 0,5, 1 und 2 für Markerchromosomen in diploiden Zellen auf folgende Entstehung schließen: a, b und d ($\bar{x} \approx 1$) in einer diploiden Zelle, e ($\bar{x} \approx 0{,}5$) in einer tetraploiden und c ($\bar{x} \approx 2$) entweder in einer haploiden Zelle oder an zwei Chromosomen in einer diploiden Zelle. Im letzten Fall wären die beiden Markerchromosomen c einer diploiden Mitose allerdings nicht homolog, da sie von verschiedenen Chromosomen stammten, sondern nur morphologisch sehr ähnlich. Eine andere Möglichkeit wäre, daß das Markerchromosom c zunächst in einfacher Ausfertigung in einer diploiden Zelle vorliegt, durch mitotische Non-disjunction jedoch beide Chromatiden in eine Tochterzelle gelangt sind, die dann beide Chromosomen auf ihre Nachkommen überträgt.

2. Lokalisation des konstitutiven Heterochromatins

Das konstitutive Heterochromatin der Metaphasechromosomen von M. agrestis läßt sich durch Markierung mit ^{3}H-Thymidin erkennen: es zeigt ein spätes Replikationsmuster. Der Zeitpunkt seiner DNS-Synthese liegt noch später als beim fakultativen Heterochromatin (PERA und WOLF, 1967; SCHMID, 1967). Eine andere Nachweismethode des Heterochromatins beruht auf dem Gehalt an hochrepetitiver DNS: durch Hitzebehandlung bei 92° C und nachfolgende längere Einwirkung von 65° C warmer Pufferlösung vorbereitete Chromosomen lassen sich mit Giemsa bevorzugt an den Orten anfärben, die aus konstitutivem Heterochromatin bestehen (ARRIGHI et al., 1970; YUNIS et al., 1971; PERA, 1972a).

2.1. Spätreplikationsmuster

In mit ^{3}H-Thymidin markierten Metaphasen zeigte von den fünf Markerchromosomen nur das Markerchromosom a ein spätes DNS-Replikationsmuster in einem größeren Abschnitt, und zwar waren die kurzen Arme, die Centromerregion sowie ein kleiner proximaler Abschnitt der langen Arme spätreplizierend (Abb. 3 a). Bei den übrigen Markerchromosomen war nur die Centromerregion markiert (Abb. 3 b - e). Eine Centromermarkierung war auch bei vielen Autosomen zu beobachten (Abb. 5 a und b); nur eines der kleinsten akrozentrischen Autosomen war fast vollständig spätreplizierend (Abb. 3 y).

2.2. Färbung des konstitutiven Heterochromatins

Nach Durchführung der Giemsa-Technik zur Darstellung des konstitutiven Heterochromatins zeigten sich folgende Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte stärker angefärbt (Abb. 5 c): Centromerregionen der meisten Autosomen; kurzer Arm, Centromerregion und proximales Viertel des langen Arms des Markerchromosoms a und ein kleines telozentrisches Chromosom. Die gleichen Chromosomenabschnitte wurden nach ^{3}H-Thymidin-Markierung als spätreplizierend erkannt (Abb. 3).

Auf Grund der Ergebnisse des Heterochromatinnachweises halten wir das Markerchromosom a für ein deletiertes X-Chromosom und das kleine heterochromatische Chromosom für den Rest eines stark deletierten Y-Chromosoms. Der lange heterochromatische Arm eines normalen X-Chromosoms könnte durch einen Bruch abgetrennt und durch mitotische Non-disjunction weitgehend verloren gegangen sein, so daß bei dem hieraus resultierenden

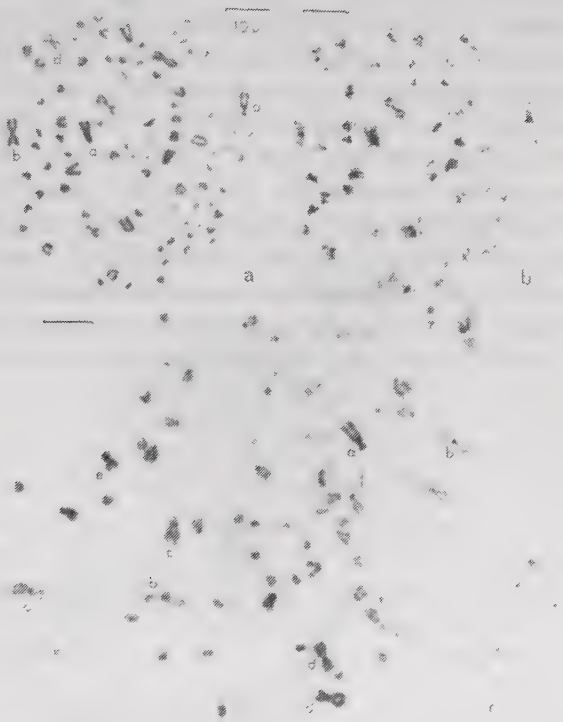

Abb. 5 a-c: Aneuploide Metaphasen von M. agrestis (♂) nach Markierung mit ^{3}H-Thymidin (a unmarkiert, b markiert) und Färbung des konstitutiven Heterochromatins (c). Die Markerchromosomen sind bezeichnet.

Chromosom der ursprünglich überwiegend euchromatische kurze Arm zum langen Arm wird und der Rest des heterochromatischen langen Arms zum kurzen. Aus anderen Kulturen von M. agrestis konnten cytologische Beweise für diesen Entstehungsmechanismus erhalten werden. So zeigt die Abb. 6 eine Anaphase aus einer Kultur einer weiblichen Erdmaus. Das Heterochromatin ist hier dunkler angefärbt. An einem der beiden X-Chromosomen ist eine Trennung eines der beiden Chromatiden zu erkennen; das distale Bruchstück ist noch mit dem unversehrten Schwesterchromatid gepaart. Es geht zusammen mit diesem Chromatid in eine Tochterzelle, während das deletierte Chromatid in die andere Tochterzelle gelangt. Auf ähnliche Weise kann auch der Verlust des größten Teils des Y-Chromosoms erklärt werden.

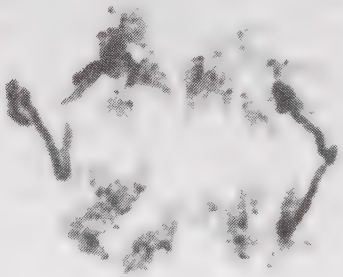

Abb. 6: Non-disjunction des distalen Teils des langen Arms eines X-Chromosoms (im Bild links) in einer Anaphase von M. agrestis (♀). Die Chromatidentrennung des anderen X-Chromosoms (rechts) erfolgt regelrecht. Giemsa-C-banding-Methode (Aus: PERA, FIRSCHING und SCHOLZ, 1974).

3. Länge der heterochromatischen Chromosomenabschnitte in diploiden und aneuploiden Zellen

Da in aneuploiden Zellen die für M. agrestis typischen großen Geschlechtschromosomen nur in stark deletierter Form vorhanden sind und sich keine Anhaltspunkte für eine Translokation des konstitutiven Heterochromatins auf andere Chromosomen fanden, muß ein echter Verlust dieses Chromosomenmaterials angenommen werden. Um diesen Verlust quantitativ zu erfassen, wurden an diploiden und aneuploiden Mitosen, die nach der Giemsa-C-banding-Technik gefärbt waren, folgende Untersuchungen durchgeführt: Von 20 aneuploiden Mitosen mit unterschiedlicher Chromosomenzahl und von 8 diploiden Mitosen wurden Photographien mit einer 7000-fachen Endvergrößerung hergestellt. Vier der diploiden Mitosen stammten aus der frühen Phase dieser männlichen Kultur, vier von einer weiblichen M. agrestis aus früheren Untersuchungen (PERA, 1972a). Auf den Photographien wurde die Gesamtlänge aller Chromosomen (in mm), die Gesamtlänge aller heterochromatischen Centromerabschnitte (autosomales Heterochromatin) sowie die Länge des konstitutiven Heterochromatins der Geschlechtschromosomen in diploiden Zellen bzw. in aneuploiden Zellen die Gesamtlänge des heterochromatischen Abschnittes von Markerchromosom a und des kleinen heterochromatischen Chromosoms (= gonosomales Heterochromatin) bestimmt. Der Anteil des autosomalen und gonosomalen Heterochromatins an der Gesamtlänge der Chromosomen wurde in Prozent ausgedrückt. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 graphisch dargestellt.

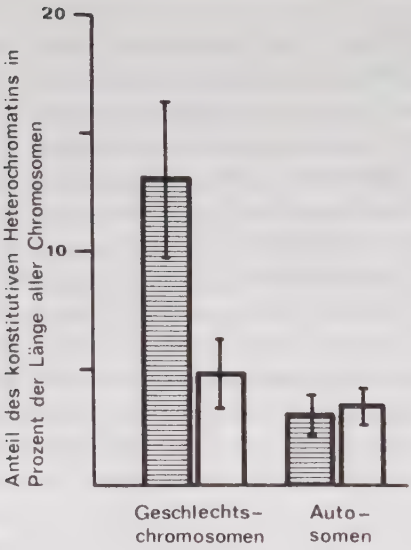

Abb. 7: Anteil des konstitutiven Heterochromatins der Geschlechtschromosomen und der Centromerregion der Autosomen an der Gesamtlänge aller Chromosomen in 8 diploiden (linierte Säulen) und 20 aneuploiden Mitosen (weiße Säulen).

In den normalen diploiden Zellen beträgt die Länge der aus konstitutivem Heterochromatin bestehenden Abschnitte der Geschlechtschromosomen 13,14 $\pm$ 3,28 % der Gesamtlänge aller Chromosomen. Die relativ große Streubreite ist auf ein unterschiedliches Kontraktionsverhalten von hetero- und euchromatischen Chromosomen im Verlauf der prometaphasischen Chromosomenverkürzung zurückzuführen. In aneuploiden Zellen wurde die Länge des

gonosomalen Heterochromatins mit 4,74 ± 1,55 % der Gesamtlänge ermittelt; dies sind 36 % des Wertes normaler Zellen.

Beim konstitutiven Heterochromatin der Autosomen lagen die Werte in aneuploiden Mitosen mit 3,43 ± 0,83 etwas höher als in diploiden Mitosen mit 3,05 ± 0,89 %, doch ist hier der Unterschied nicht signifikant.

DISKUSSION

Die Chromosomenuntersuchungen an einer Zellkultur einer männlichen Erdmaus, M. agrestis, die sich über eine längere Kulturzeit erstrecken, zeigten,

1. daß im Verlauf der Kulturzeit ein erheblicher Verlust von konstitutivem Heterochromatin eingetreten ist,
2. daß der Verlust eines großen Teils des konstitutiven Heterochromatins die Lebensfähigkeit der Zellen anscheinend nicht beeinträchtigt,
3. daß in derselben Kultur auch die euchromatischen Autosomen von numerischen und strukturellen Veränderungen betroffen waren, und
4. daß die Vermehrungsfähigkeit der Zellen auch nach fast einjähriger Kulturzeit noch voll erhalten war.

Um der Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen dem Heterochromatinverlust und der Zellentartung nachgehen zu können, müssen wir uns zunächst mit den beiden Begriffen Heterochromatin und Zellentartung im einzelnen befassen.

1. Heterochromatin

1.1. Definition

"Als Heterochromatin bezeichne ich also ein in der Grundsubstanz des Ruhekerns sichtbar vorhandenes, in Bezug auf die Längsrichtung des Chromosoms bestimmt gelegenes Stück desselben, welches mindestens in der Telo- und Prophase, manchmal auch in der Anaphase und

Metaphase stärker färbbar ist als die übrigen Stücke, als das die Grundsubstanz bildende Euchromatin" (HEITZ, 1933). Das Sichtbarbleiben von Chromosomenabschnitten auch im Interphasekern, durch fehlende Entspiralisation verursacht, ist ein Merkmal des Heterochromatins; man nennt diese Eigenschaft Heteropyknose. Über die mögliche Funktion des Heterochromatins schrieb HEITZ folgendes: Da nun fraglos die Erscheinung der Heterochromatie eine abgeleitete ist ..... und darin besteht, daß diese Strukturveränderung von einzelnen Chromosomen bzw. Chromosomenstücken nicht durchgemacht wird, liegt die Annahme am nächsten, daß dieses Kompaktbleiben bestimmter Chromosomenstücke eben mit einer "Untätigkeit" der hier gelagerten Gene in Zusammenhang steht."

Seit den ersten Beobachtungen des Heterochromatins mit vorwiegend deskriptiven Definitionen von Heteropyknose und "genetischer Passivität" durch HEITZ sind zahlreiche biochemische und cytologische Informationen über das Heterochromatin gewonnen worden. Die Arbeiten von SCHRADER (1929) und LYON (1961) verhalfen zu der Einsicht, daß man zwei verschiedene Arten von Heterochromatin unterscheiden muß.

1.2. Fakultatives und konstitutives Heterochromatin bei M. agrestis

Da wir es bei der in dieser Arbeit untersuchten Kultur nur mit Zellen eines männlichen Tieres zu tun haben, das kein fakultatives Heterochromatin besitzt, kann dieser Abschnitt kurz gehalten werden. Unter fakultativem Heterochromatin verstehen wir den Zustand eines zunächst genetisch aktiven Chromosoms, das irgendwann

in der Ontogenese inaktiviert wurde. Beim Säuger ist das fakultative Heterochromatin nur im weiblichen Geschlecht anzutreffen. Hier ist eines der beiden X-Chromosomen heterochromatisch; es zeigt die Eigenschaften der späten DNS-Synthese, der Heteropyknose (im Interphasekern ist das inaktive X als Sexchromatin- oder Barr-Körperchen sichtbar) und der genetischen Inaktivität. Nach der Lyon-Hypothese (LYON, 1961) ist die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen als Dosiskompensationsmechanismus anzusehen, der bewirkt, daß im weiblichen wie im männlichen Geschlecht (mit nur einem X-Chromosom) die gleiche Anzahl X-gebundener Gene wirksam werden können.

Bei M. agrestis ist das fakultative Heterochromatin auf den kurzen Armen des X_2-Chromosoms lokalisiert; morphologisch läßt sich das X_2 in der Metaphase vom X_1 durch die sogenannte "Chromatidapposition" der kurzen Arme unterscheiden (SCHMID, 1967).

Die DNS-Synthese des fakultativen Heterochromatins beginnt später als die des Euchromatins, aber nicht so spät wie die des konstitutiven Heterochromatins. Im Falle von M. agrestis fängt die DNS-Replikation des fakultativen Heterochromatins nach 60 % der Gesamtsynthesedauer an und endet bei 90 % (PERA, 1968).

Das konstitutive Heterochromatin ist bei M. agrestis vom fakultativen Heterochromatin klar abzugrenzen durch sein gesetzmäßiges Vorkommen auf jeweils homologen Chromosomenabschnitten der beiden X-Chromosomen bzw. auf dem X und Y. Auf Grund seiner Analysen an heterochromatischen Elementen des X- und Y-Chromosoms von Drosophila melanogaster repräsentieren für COOPER (1959) euchromatische und heterochromatische

Abschnitte je einem von mehreren möglichen morphologischen Zuständen. Nach seinen Beobachtungen haben sowohl Chromosomenabschnitte als auch ganze Chromosomen die Möglichkeit, zu einem Zeitpunkt euchromatisch, zu einem anderen heterochromatisch zu sein. Ebenso bezeichnete BROWN (1966) Euchromatin und Heterochromatin "as states rather than substances." Im Gegensatz dazu sprach SCHMID (1967) von "strukturellem" konstitutivem Heterochromatin, dessen Eigenschaften der Kondensation in der Interphase und der frühen Prophase, sowie der späten DNS-Replikation eindeutig kennzeichnend sind.

Die beiden Auffassungen über das Wesen des konstitutiven Heterochromatins, "Zustand" (der wechseln kann) oder "festgelegter, struktureller Bestandteil eines Chromosoms" stehen auch heute noch nebeneinander und führen bei der Diskussion über die Lokalisation und Funktion des Heterochromatins oft zu Mißverständnissen. In dieser Arbeit soll das konstitutive Heterochromatin nur als struktureller Bestandteil bestimmter Chromosomen angesehen werden und nicht als ein bestimmter Zustand.

Bei M. agrestis bestehen folgende Chromosomenabschnitte aus konstitutivem Heterochromatin: die langen Arme des Y, die langen Arme und der proximale Teil der kurzen Arme der weiblichen X_1- und X_2-Chromosomen und des männlichen X-Chromosoms, das dem X_1 des Weibchens entspricht (WOLF et al., 1965; SCHMID et al., 1965; SCHMID, 1967). Kleine Stücke von konstitutivem Heterochromatin sind in der Centromerregion der Autosomen zu finden (ARRIGHI et al.; 1970, PERA, 1972a).

Nach Markierung mit ^{3}H-Thymidin, das während der DNS-Synthese-Periode von den replizierenden Chromosomen

eingebaut wird, läßt sich die DNS-Synthese jedes einzelnen Chromosoms verfolgen. Bei M. agrestis wurden diese Untersuchungen von WOLF et al. (1965), SCHMID et al. (1965), PERA und WOLF (1967), SCHMID (1967), PERA (1968 und 1970) und SCHMID und LEPPERT (1969) durchgeführt. Das konstitutive Heterochromatin von M. agrestis, das sich auf 3/4 beider X-Chromosomen und auf dem Y-Chromosom befindet, beginnt seine DNS-Synthese bei ca. 70 % der gesamten S-Periode und dauert bis zum Ende der S-Periode, wobei ein Teil des X_2 etwa 3 Minuten länger synthetisiert als das X_1 (PERA, 1968).

1.3. Molekularer Aufbau des Heterochromatins

Aus zwei Gründen möchte ich den folgenden Abschnitt über Darstellungsmethoden des konstitutiven Heterochromatins ausführlicher behandeln. Einmal ist die in unseren Untersuchungen benutzte Methode neu, zum anderen sind gerade seit der Einführung spezieller in situ DNS-RNS-Hybridisierungstechniken (JONES, 1970; PARDUE und GALL, 1970) und Färbemethoden (ARRIGHI et al., 1970; YUNIS et al., 1971; SCHNEDL, 1971) große Fortschritte in der Aufklärung der molekulären Strukturen der Chromosomen und des konstitutiven Heterochromatins erzielt worden. Diese Methoden basieren auf einer DNS-Denaturierung und Renaturierung, die vor allem in Chromosomenabschnitten mit repetitiven Nukleotidsequenzen stattfinden soll (BRITTEN und KOHNE, 1968). Eine anschließende Giemsafärbung erzielt bei den Chromosomen des Menschen und vieler Säugetiere eine intensive Färbung der Centromerregionen. Bei den aus drei verschiedenen Chromatinarten zusammengesetzten Geschlechtschromosomen von M. agrestis (Euchromatin, fakultatives und konstitutives Heterochromatin) werden diejenigen Abschnitte stark gefärbt, von denen man annimmt, daß

sie aus konstitutivem Heterochromatin bestehen (ARRIGHI et al., 1970; ARRIGHI und HSU, 1971; YUNIS et al., 1971; PERA, 1972a, COOPER und HSU, 1972). YASMINEH und YUNIS (1969) konnten zeigen, daß das konstitutive Heterochromatin vorzugsweise aus hochrepetitiven Polynukleotidsequenzen, sog. Satelliten-DNS, besteht. Diese besondere DNS ist sowohl artspezifisch als auch spezifisch für bestimmte Chromosomensegmente; sie ist zu allen Zeiten des Zellcyklus und während der gesamten Entwicklung eines Säugetieres nachweisbar. Nach YUNIS (1973) ist die Sat-DNS unfähig, Proteine zu kodieren; Untersuchungsergebnisse mit ^{3}H-Uridin sprachen auch bei M. agrestis für eine genetische Inaktivität großer Teile der Geschlechtschromosomen (SIEGER, PERA und SCHWARZACHER, 1970).

YASMINEH und YUNIS (1971) beobachteten einen auffälligen Unterschied zwischen dem prozentualen Gehalt an Sat-DNS und an Heterochromatin. Bei M. agrestis etwa fand sich nur 8 % Sat-DNS, obwohl der Anteil des konstitutiven Heterochromatins am Gesamtgenom ca. 15 % beträgt. Nach Hitzedenaturierung wurde der Cot-Wert[+] bestimmt. Hierbei ließen sich drei Fraktionen von repetitiver DNS mit niedrigen Cot-Werten unterscheiden. Je niedriger der Cot-Wert ist, um so schneller ist die Reassoziationsgeschwindigkeit nach Denaturierung und um so größer ist die Zahl von repetierten Nukleotidsequenzen. Im Fall von M. agrestis gibt es einen sogenannten Sat-I-Typ, der 2 % des Genoms einnimmt, einen Sat-II-Typ mit 6 % und einen "fast intermediate repetitive DNA"-Typ, dessen Anteil 15 % beträgt und somit die größte Fraktion von repetitiver DNS innerhalb des konstitutiven Heterochromatins darstellt. Das Verhältnis von $\overline{AT}$-Basen zu $\overline{GC}$-Basen ist in allen Fraktionen größer als 1, in Sat-I-DNS sogar 2,00 (YASMINEH und YUNIS, 1971).

[+] Co = initial concentration of DNA in moles of nucleotide/liter; t = reassociation time in sec.

Wie wir oben gesehen haben, werden die verschiedenen Fraktionen von repetitiver DNS durch ihre unterschiedlichen, aber stets großen Reassoziationsgeschwindigkeiten nach Denaturierung charakterisiert. Die Gewinnung einer bestimmten Sat-DNS durch Zentrifugation erfolgt in einem Cs-Cl-Dichtegradienten oder durch Inkorporation von Ag^+ oder Hg^+ in die DNS und anschließendem Zentrifugieren in Cs_2SO_4. So wurden z. B. mehrere Sat-Fraktionen in der DNS von Mus caroli, Mus cervicolor und Mus musculus isoliert (SUTTON und Mc CALLUM, 1972). Die Frage nach den einzelnen Basensequenzen der Sat-DNS kann wegen des Mangels geeigneter Methoden, die DNS-Moleküle in überschaubare Abschnitte aufzuspalten, bisher noch nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Die einzige geeignete analytische Methode unterbricht die DNS-Sequenz an jeder Purinbase (G/A), und man erhält Pyrimidinsequenzen mit einer Phosphatgruppe an jedem Ende (SWARTZ, TRAUTNER und KORNBERG, 1962). Auf diese Weise wurden Pyrimidinabschnitte der Sat-DNS der Maus untersucht (SOUTHERN, 1970). So ist es möglich, kleine Abschnitte von Pyrimidinbasensequenzen zu überblicken und durch Zuordnung der komplementären Basen einen Teil des DNS-Moleküls zu analysieren. Bei der Maus wurden Sequenzen gefunden, die ausschließlich aus T oder C bestanden. Diese waren jeweils mehrfach wiederholt, z. B. 11-oder 19-mal (SOUTHERN, 1970). Weiterhin traten Dimere, Trimere bis zu Hexameren der Pyrimidinbasen auf. Bei diesen Untersuchungen stellte man außerdem fest, daß die Sequenzfolge dieser kurzen, oft wiederholten Einheiten einem übergeordneten System unterliegen, das ca. 120 Basenpaare umfaßt. Bisher ist es jedoch nicht möglich, die gesamte Ordnung der kleinen repetitiven Basenpaare - auch repetitive DNS-Familie genannt - innerhalb der größeren Sequenzeinheiten zu überblicken. Offensichtlich bestimmen die multiplen

Kopien innerhalb einer längeren Sequenz die hohe Reassoziationsgeschwindigkeit, die man bei den Versuchen mit der DNS/RNS-Hybridisierungstechnik beobachtet.

PARDUE und GALL (1970) und ARRIGHI und HSU (1971) hielten es für möglich, daß die Färbungsmuster des konstitutiven Heterochromatins in Metaphasechromosomen durch eine vom Euchromatin sich unterscheidende "reannealing rate" der verschiedenen DNS-Familien entstehen. Die "unique copy DNA" des Euchromatins bleibt nach der Dissoziationsbehandlung denaturiert, während die repetitive, "heterochromatische" DNS renaturiert. Diese Erklärung, als Arbeitshypothese weit verbreitet, ist jedoch noch nicht bewiesen worden. Beim Vergleich zwischen der Giemsamethode und der Färbung mit dem Fluorchrom Quinakrin-mustard (QM) fanden NATARAJAN und GROPP (1972) bei Metaphasechromosomen von M. agrestis, daß das konstitutive Heterochromatin der Geschlechtschromosomen mit beiden Methoden, das konstitutive Heterochromatin der Centromerregionen jedoch nur mit der Giemsa-Methode stärker anfärbbar ist.

Die Resultate der beiden Färbemethoden veranlaßten sowohl NATARAJAN und GROPP (1972) als auch EVANS (1973) zu der Meinung, daß die Färbungsmuster - in Anordnung und Verteilung bei den einzelnen Spezies weitgehend konstant - weniger von der Basenzusammensetzung der Sat-DNS als vielmehr von der Sekundärstruktur der Chromosomen abhängig sind. Die im Elektronenmikroskop sichtbare Feinstruktur der Chromosomen zeigt ca. 100 Å dicke Elementarfibrillen, die wahrscheinlich eine DNS-Doppelhelix enthalten. An diese lagern sich - sie verstärkend und längenmäßig reduzierend - bestimmte arginin- und lysinreiche basische Proteine (Histone) an, deren Funktion noch wenig geklärt ist (LAMPERT, 1969). Eine

spezifische Beziehung dieser Histone zur repetitiven DNS wäre somit denkbar. So könnte der Grund für die fehlende Färbung des konstitutiven Heterochromatins der autosomalen Centromere mit QM im Gegensatz zum gonosomalen konstitutiven Heterochromatin ein unterschiedlich organisierter struktureller Aufbau der beiden Heterochromatin-Typen sein.

Experimente mit dem Benzimidazolderivat "Hoechst Nr. 33258", das einer von den Quinakrinen unabhängigen Gruppe von Fluorochromen angehört (SETH und GROPP, 1973), zeigten bei der Maus und beim Igel intensive Färbungen hauptsächlich in perizentrischen heterochromatischen Regionen. Dies läßt ebenfalls vermuten, daß das konstitutive Heterochromatin nicht aus einem einheitlichen Material besteht, sondern daß unterschiedliche Typen von konstitutivem Heterochromatin existieren, die durch die derzeitigen Methoden nicht genügend aufgedeckt werden können. In Übereinstimmung mit anderen Autoren (WEISBLUM und De HASETH, 1972; ELLISON und BARR, 1972) halten SETH und GROPP (1973) die Intensität der Fluoreszenz des konstitutiven Heterochromatins für abhängig vom Verhältnis der Basenpaare A/T zu G/C, und zwar ist die Fluoreszenz um so stärker, je größer dieser Quotient ist. Nach dieser Aussage müßten die Centromerregionen hauptsächlich aus G/C-Basenpaaren zusammengesetzt sein. SCHNEDL (1973) fand bei seinen Untersuchungen an Rinderchromosomen eine repetitive DNS-Fraktion mit hohem $\overline{GC}$-Gehalt in Regionen, die nach seiner Meinung konstitutives Centromer-Heterochromatin enthalten.

1.4. Mögliche Funktionen des konstitutiven Heterochromatins

Trotz zahlreicher Beobachtungen über das Verhalten und die Struktur des konstitutiven Heterochromatins ist man heute noch immer nicht in der Lage, seine funktionelle Bedeutung vollständig zu verstehen. Anhand der drei charakteristischsten Eigenschaften des konstitutiven Heterochromatins lassen sich jedoch einige Vermutungen über seine Rolle innerhalb der Zelle formulieren.

1.4.1. Folgerungen aus der späten DNS-Synthese

Durch die im Vergleich zum Euchromatin und fakultativem Heterochromatin späte und kurze Synthesezeit des konstitutiven Heterochromatins sind ausgleichende Reparaturen während der kurzen DNS-Synthese weniger wahrscheinlich. Abweichungen der Nukleotidsequenzen im konstitutiven Heterochromatin bleiben so länger erhalten und haben dadurch eine größere Möglichkeit sekundär weitere Läsionen zu verursachen (ENGEL, KRONE und WOLF, 1967).

1.4.2. Folgerung aus dem heteropyknotischen Verhalten

Die Eigenschaft "Heteropyknose"(= kondensierter Zustand von Chromosomen oder Chromosomensegmenten im Interphasestadium) des konstitutiven Heterochromatins ist bei M. agrestis nicht grundsätzlich in jedem Zelltyp vorhanden (SCHMID et al., 1965). In Nervenzellen etwa ist das konstitutive Heterochromatin heteropyknotisch und bildet im Interphasekern große, kompakte Chromozentren, während es z. B. in Leberzellen isopyknotisch ist. Doch kann auch nicht kondensiertes Heterochromatin

auf Grund seines Gehalts an repetitiver DNS durch die Giemsa-Methode sichtbar gemacht werden. Es erscheint dann in Form von zwei langen Fäden, die fast immer durch den Nukleolus ziehen oder das perinukleoläre Chromatin bilden (PERA, 1972b). Diese Beobachtungen über die Nukleolusassoziation des konstitutiven Heterochromatins im Interphasekern stimmen mit den Befunden von NATARAJAN und SHARMA (1971) an Mitosen von M. agrestis überein. Auch bei Interphasekernen von Mus musculus und Mus poschiavinus berichten NATARAJAN und GROPP (1972) von einer Assoziation von Heterochromatin und Nukleolus.

Elektronenmikroskopisch besteht kein struktureller Unterschied zwischen dem perinukleolären Chromatin und den Chromozentren. Interphasezellen mit heteropyknotischem konstitutivem Heterochromatin in den distalen Nierentubuli von M. agrestis zeigten große Chromozentren, die mit dem verhältnismäßig kleinen Nukleolus nicht assoziiert waren. In Zellen ohne Chromozentren (proximale Nierentubuli) waren dagegen große Nukleoli vorhanden, die von perinukleolärem Chromatin, vermutlich dem isopyknotischen konstitutiven Heterochromatin, umschlossen wurden (PERA und KINSKY, 1973).

Wie aus diesen Untersuchungen deutlich wird, lassen sowohl die Lokalisation des konstitutiven Heterochromatins im Interphasekern, als auch seine Struktur eine funktionelle Beziehung zum Nukleolus vermuten; eine gegenseitige Abhängigkeit zwischen Nukleolusausbildung und Kontraktionszustand des konstitutiven Heterochromatins kann als wahrscheinlich angenommen werden (KINSKY und PERA, 1973). NATARAJAN und SHARMA (1971) nahmen an, daß im konstitutiven Heterochromatin Gene für ribosomale RNS lokalisiert sind.

Die neueste Literatur über dieses Thema stellt die Annahme einer vollständigen genetischen Inaktivität des konstitutiven Heterochromatins verstärkt in Frage. Bei Untersuchungen an den heterochromatischen Segmenten von menschlichen C_9-Chromosomen während der ersten meiotischen Prophase wurden ein enger Kontakt zwischen C_9-Heterochromatin und nukleolusähnlichem Material sowie morphologische Veränderungen dieser Segmente beobachtet (GAGNÉ, LUCIANI, DEVICTOR-VUILLET und STAHL, 1974). Die Autoren schrieben dem Verhalten des C_9-Heterochromatins in der Meiose eine spezifische Funktion und physiologische Bedeutung zu. Die beobachteten Veränderungen sind Ausdruck einer Syntheseaktivität, die GAGNÉ et al. für das Ergebnis einer ganz bestimmten Stimulierung hielten.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von LAKHOTIA und JACOB (1974) an Speicheldrüsenzellen von Drosophila melanogaster beziehen sich ebenfalls auf die Transkriptionsaktivität von konstitutivem Heterochromatin während der Meiose. Das Chromozentrum zeigt bei beiden Geschlechtern zwei unterschiedlich organisierte Komponenten, die als α - und ß-Heterochromatin bezeichnet wurden. Während das α -Heterochromatin durch Inaktivität und "non-essential" - Natur charakterisiert ist, fand sich im ß-Heterochromatin nach in vitro Markierung mit ^{3}H-Uridin eine RNS-Synthese, deren Rate ebenso groß war wie im Euchromatin.

In unseren Untersuchungen wurden nach einem erheblichen Verlust von konstitutivem Heterochromatin keine auffälligen Nukleolusveränderungen festgestellt. Genauere Untersuchungen in dieser Richtung wurden jedoch nicht durchgeführt.

1.4.3. Folgerungen aus dem Aufbau aus hochrepetitiver DNS

Die mögliche Aufgabe des konstitutiven Heterochromatins, Chromosomenregionen wie die der Centromere und des Nukleolusorganisators zu schützen (NATARAJAN und GROPP, 1972; LAKHOTIA und JACOB, 1974), kann mit der Tatsache vereinbar sein, daß die repetitive DNS selbst bis zu einem bestimmten Grad umorganisiert und verändert wird.

Nahe verwandte Spezies können gänzlich verschiedene Sat-DNS besitzen (HENNIG und WALKER, 1970), so daß molekulare Veränderungen bei der Artentwicklung augenscheinlich sehr schnell vor sich gehen und vor allem die hochrepetitiven Sequenzen betreffen. Vergleichende Untersuchungen über evolutionsbiologische Vorgänge bei Mensch und Tier beziehen sich hauptsächlich auf die verschiedenen Substitutions- und Divergenzerscheinungen innerhalb der Sat-DNS (KOHNE, 1970). In diesem Zusammenhang ist eine Mitwirkung der hochrepetitiven DNS beim Austausch von chromosomalen Nukleotidsequenzen und damit der Evolution des Karyotyps denkbar.

Rasch verlaufende strukturelle Umwandlungen der Sat-DNS wurden auch unter einem anderen Gesichtspunkt verfolgt. SOUTHERN (1971) stellte fest, daß die Sat-DNS eine große Anzahl von Mutationen toleriert und sogar ganze Stückverluste von heterochromatischen Segmenten die weiteren Zellteilungen und das Wachstum nicht beeinträchtigen können. Um mehr Einsichten über die Bedeutung des konstitutiven Heterochromatins und seiner repetitiven DNS für die einzelne individuelle Zelle zu gewinnen, wurden Aberrationen mit Hilfe von mutagenen Agenzien (Chemikalien, Bestrahlungen und Viren) induziert, die vor allem in den konstitutiven heterochromatischen Chromosomensegmenten auftraten (HUANG,

1967; SCHNEIDER und WALDEMAIER, 1969). Nach NATARAJAN und SHARMA (1971) macht die Konzentration der Satelliten-DNS in diesen Chromosomen die Heterochromatinsegmente empfänglicher für die Bildung von Aberrationen.

2. Zeichen der Entartung der Zellen

Bei der in dieser Arbeit beschriebenen männlichen M. agrestis-Kultur ist der ursprünglich normale Karyotyp durch chromosomale Aberrationen verändert worden.

2.1. Numerische Aberrationen

Nach Verlust der exakt diploiden Chromosomenzahl zwischen der 6. und der 16. Subkultur bildeten sich zunächst zwei Stammlinien aus, eine im hypodiploiden, die andere im hypotetraploiden Bereich. Im weiteren Verlauf schritt die Ausbildung der Aneuploidie weiter fort zu Chromosomenzahlen, die über einen weiten Bereich verteilt waren, ohne dabei eine bestimmte Ploidie zu bevorzugen.

2.2. Morphologische Aberrationen

Morphologische Veränderungen an den Chromosomen zeigten sich in Form von Markerchromosomen, die vermutlich zum Teil durch Robertsonsche Translokationen, zum Teil durch Stückverluste entstanden waren. Die Fusion von je zwei akrozentrischen zu einem metazentrischen Chromosom dürfte auch die Ursache für den anfänglichen Rückgang der Chromosomenzahl gewesen sein. Aus der unterschiedlichen Häufigkeit der Markerchromosomen

ließen sich Rückschlüsse darauf ziehen, in welcher Ploidiestufe die Translokation stattgefunden hatte. Die Markerchromosomen waren, nachdem sie einmal aufgetreten waren, in allen weiteren Kulturstadien zu finden; neue traten nicht mehr hinzu. Dies bedeutet, daß die Veränderungen innerhalb eines relativ kurzen Zeitraumes aufgetreten sind, vermutlich nur in wenigen Zellen, wenn nicht sogar in einer einzigen Zelle, deren Tochterzellen sich dann auf Grund ihrer besseren Lebensfähigkeit in der Kultur durchsetzen konnten.

2.3. Verlust des konstitutiven Heterochromatins der Geschlechtschromosomen

Nach Anfärbung des konstitutiven Heterochromatins ließ sich eines der Markerchromosomen als deletiertes X-Chromosom identifizieren. Dieses Chromosom bestand nur noch aus den ursprünglich kurzen, euchromatischen Armen, dem Centromer und einem kurzen Stück der ursprünglich langen heterochromatischen Arme. Außerdem fand sich ein kleines zentrisches Fragment, das aus konstitutivem Heterochromatin bestand; dieses Fragment wurde als Rest des Y-Chromosoms angesehen. Die Längenbestimmungen ergaben einen Verlust von 64 % des konstitutiven Heterochromatins im Vergleich zu normalen Zellen. Für die Verminderung des Heterochromatingehaltes sind primär Chromosomenbrüche verantwortlich. Spontane Brüche und Deletionen kommen im Heterochromatinanteil der Geschlechtschromosomen von M. agrestis häufig vor (PERA, 1969). NATARAJAN und AHNSTRÖM (1973) beobachteten bei M. agrestis eine erhöhte Bruchfrequenz der Isochromatiden der X-Chromosomen im konstitutiven Heterochromatin-Segment und führten die Häufigkeit dieser Art der Chromatidenaberration auf die Bildung

von zwei getrennten Chromocentren in der Interphase zurück. An diese Isochromatidbrüche sind meist Schwesterreunionen angeschlossen. SCHNEIDER und WALDENMAIER (1969) fanden in röntgenbestrahlten Fibroblastenkulturen von M. agrestis wesentlich mehr Brüche in heterochromatischen als in euchromatischen Chromosomenabschnitten. Einige Wochen nach der Bestrahlung lag das Bruchverhältnis zwischen Euchromatin und Heterochromatin in weiblichen Zellen bei 1 : 4,5, in männlichen Zellen bei 1 : 5,7.

In Abb. 6 dieser Arbeit wurde gezeigt, wie nach einem Bruch im langen Arm eines X-Chromosoms in einer Zelle während der Anaphase die ungleiche Verteilung der Chromatiden auf die Tochterzelle erfolgt. Durch die Nicht-Trennung der Chromatiden in der Anaphase (= mitotische Non-disjunction) wird das distale Fragment an eine Tochterzelle weitergegeben, zusammen mit dem unbeschädigten Chromatid; die andere Tochterzelle tritt mit einem verkürzten X-Chromosom in die Interphase. Das distale Bruchstück besitzt kein Centromer. Ohne diese Orientierungsmöglichkeit bleibt in der nächsten Mitose die Polwanderung des azentrischen Fragmentes aus, und es gelangt in keine der beiden Tochterzellen (SWANSON, 1960). Die Folge ist schließlich ein Verlust des deletierten Chromosomenstücks, auch in den Nachkommen dieser Zelle.

Die Veränderungen des Chromosomenkomplements bezüglich Zahl und Morphologie der Chromosomen, sowie die Verringerung des Heterochromatingehaltes sind typisch für entartete Zellen (LEVAN und HAUSCHKA, 1953; HSU, 1954 a und b). Darüber hinaus entspricht die Art des Zellwachstums, nämlich im euploiden Stadium langsames Wachstum, mit steigender Aneuploidie sehr rasches

Wachstum, dem charakteristischen Bild der Zellentartung. Anscheinend sind das Auftreten von Markerchromosomen und der beträchtliche Verlust von konstitutivem Heterochromatin zumindest ohne hemmenden Einfluß auf die Proliferationsfähigkeit der Gewebekultur, wenn nicht sogar eine Proliferationssteigerung bewirkt wird. Auch NATARAJAN und GROPP (1971) bemerkten, daß Heterochromatinstücke in Gewebekulturen verloren gehen können, ohne Zellteilungen und Zellwachstum zu behindern. Da das maligne Wachstum dieser Kultur weder an das Auftreten einer bestimmten Chromosomenzahl, noch an ein offensichtlich gesetzmäßiges Erscheinen von Markerchromosomen gebunden war, stellt sich die Frage nach der Ursache der neoplastischen Proliferation. Nach RUTISHAUSER (1963) ist malignes Wachstum auch mit Chromosomengarnituren möglich, die so wenig vom normalen Status abweichen, daß die Differenzen in einer groben numerischen und strukturellen Analyse nicht nachgewiesen werden können. Nach SANDRITTER, HILWEG, ENGELHARDT, KIEFER und KIEFER (1965) stellt eine aneuploide DNS- oder Chromosomenstammlinie keine unbedingt notwendige Voraussetzung für das Angehen eines Tumors dar. Auch diploide Zellstämme können als Tumoren wachsen.

3. "Gesteigerte Heterochromatisierung als pathogenetisches Prinzip" (nach HARBERS und SANDRITTER, 1968)

Im folgenden soll die Frage nach der Bedeutung des Heterochromatinverlustes im Zusammenhang mit einer Zellentartung diskutiert werden.

SANDRITTER (1970) definierte das Heterochromatin als "kondensiertes (dicht gepacktes), auch heteropyknotisch

genanntes Chromatin" und bezeichnete "nicht kondensiertes (lockeres, fein granuläres oder diffus verteiltes), isopyknotisches Chromatin" als Euchromatin. Seine weiteren Kriterien der beiden Begriffe stimmen mit den schon genannten weitgehend überein (DNS-Replikationsmuster, DNS-Zusammensetzung, etc.).

Nach Behandlung von Mäusen mit Thioacetatamid und Nitrosemorphilin beobachtete SANDRITTER (1970) eine Zunahme von kondensiertem Chromatin in den Zellkernen der Leber ("Heterochromatisierung"). Das Verhältnis von Euchromatin zu Heterochromatin änderte sich von 80 : 20 auf 60 : 40, d. h. es fand eine Zunahme der heterochromatischen DNS-Fraktion auf Kosten des Euchromatinanteils statt und zwar "bevor Tumoren in der Leber entstanden waren". Bei der Umwandlung von normalen Bindegewebszellen in Tumorzellen veränderte sich nach einjähriger Züchtungszeit das "feingranuläre Chromatin" in Interphasezellen zu "einer Kernstruktur, die mit Auftreten der aneuploiden Stammlinie deutlich vergröbert war und größere heterochromatische Bezirke aufwies" (SANDRITTER et al., 1965). Quantitative DNS-Bestimmungen an normalem Mammagewebe und Mammatumoren ergaben eine Erhöhung der heterochromatischen Zentren und der absoluten Gesamtmenge an DNS im Heterochromatin der Tumorzellen (SANDRITTER, 1973). "Unsere eigenen Untersuchungen an Lebergeweben ..... zeigten eine fortschreitende Heterochromatisierung von 20 % auf 50 % bei zunehmender Dauer der Cancerisierung" (SANDRITTER, KIEFER, KIEFER, SAHN, MOORE, GRIMM, 1974) und "mit der Carcinogenese kann in der Tat eine gesteigerte Heterochromatisierung verbunden sein" (HARBERS und SANDRITTER, 1973).

Aus ihren Untersuchungen leiteten HARBERS und SANDRITTER ein "pathogenetisches Prinzip" ab, "das die Informationsunterdrückung im Zellkern bei verschiedenen pathologischen

Zuständen zum Inhalt hat - also Heteropyknose bzw. Heterochromatisierung als morphologisches Äquivalent eines Verlustes der verfügbaren Information der DNS". Folgen der pathologisch gesteigerten Heterochromatisierung könnten der Zelltod oder der Ausfall spezifischer Zelleistungen sein, bei zusätzlicher Ausschaltung der Wachstums-Kontrollmechanismen wäre auch die Cancerogenese möglich. Die Heterochromatisierung schließt die Verhinderung einer Euchromatisierung mit ein und bedeutet damit eine Einschränkung der verfügbaren genetischen Information (HARBERS und SANDRITTER, 1968). Allerdings schließen HARBERS und SANDRITTER (1973) nicht aus, daß die Heterochromatisierung auch nur eine Folge pathologischer Zellprozesse und nicht deren Ursache sein könnte.

In den Arbeiten von SANDRITTER und Mitarbeitern wird zwar nicht die Vermehrung von heterochromatischen Chromosomen, aber doch die "Heterochromatisierung" von bisher euchromatischen Chromosomen als pathogenetisches Prinzip aufgefaßt. Nach unseren Untersuchungen ist dagegen ein Verlust des Heterochromatins mit Entartung verbunden. Es ist allerdings kaum zu entscheiden, ob der Heterochromatinverlust Ursache oder Folge der Zellentartung war, da die Karyotypveränderungen und das gesteigerte Zellwachstum gleichzeitig auftraten. Die Häufigkeit spontaner Deletionen und Aberrationen in Heterochromatinabschnitten und die Beobachtung, daß ein Verlust von Heterochromatin vom Organismus besser überstanden wird, als wenn es sich um die gleiche Menge von Euchromatin handelt (SWANSON, 1960), sprechen jedoch mehr dafür, daß in der beschriebenen Kultur der Heterochromatinverlust die Ursache der Entdifferenzierung war.

4. Aufgabe des Heterochromatins im Individuum und in der Evolution

Die bisher erwähnten Beobachtungen und Interpretationen sprechen einerseits für eine genetische Inaktivität oder geringe Aktivität des konstitutiven Heterochromatins, andererseits gibt es Hinweise für seine Aktivität als Nukleolus-Organisator. Die repetitive Struktur der DNS legt die Vermutung nahe, daß die Aufgabe des Heterochromatins weniger qualitativ als vielmehr quantitativ ist und sich "größtenteils auf Zellteilung, Zellwachstum und embryonale Differenzierung" bezieht (SWANSON, 1960).

In der von uns untersuchten M. agrestis-Kultur wurde kein signifikanter Unterschied im Anteil des Centromer-Heterochromatins zwischen normalen und aneuploiden Zellen gefunden. Wie oben erwähnt, besitzt das konstitutive Heterochromatin der Centromere möglicherweise eine andere molekulare Zusammensetzung der repetitiven DNS als das der Geschlechtschromosomen (ARRIGHI et al., 1970). BRITTEN und DAVIDSON (1969) sahen das Centromer-Heterochromatin als einen Kontrollmechanismus der repetitiven DNS an, der das Aus- und Einschalten von Gengruppen gestattet und zu seiner Funktion DNS-Abschnitte mit gleichen Basensequenzen benötigt, während JONES und ROBERTSON (1970) annahmen, daß hochrepetitive Sequenzen dazu beitragen, nicht homologe Chromosomenabschnitte zusammenzubringen, um auf diese Weise ihre Interaktion im Metabolismus zu regulieren.

"Eine DNS-Basensequenz, bei der alle Arten von Mutationsveränderungen erlaubt sind, trägt augenscheinlich nicht zum Wohlbefinden eines Organismus bei, und aus diesem Grund hat es keine Funktion" (OHNO, 1973). OHNO nennt

die reiterierte DNS "junk", die "may serve as a damper to give a reasonable long cell generation time" (für seine Organentwicklung während der Embryonalentwicklung).

Bei Chromosomenanalysen verschiedener Igelspezies stellten GROPP, CITÖLER und GEISLER (1969) eine "ausgeprägte Tendenz zur Karyotypvariation" fest, für deren Entstehung vor allem in den heterochromatischen Chromosomensegmenten günstige Bedingungen sind. Der inaktive Anteil des Genoms - das konstitutive Heterochromatin - ermöglicht der Zelle Strukturvariationen in der Evolutionsphase bei Aufrechterhaltung der genetischen Aktivität des Euchromatins.

Um der Fülle der dem konstitutiven Heterochromatin zugeschriebenen Eigenschaften und Funktionen eine weitere hinzuzufügen, seien als letztes Beispiel die Untersuchungen von YUNIS (1973) aufgeführt. Auf Grund seiner Befunde über die Inkorporation von SV 40-Virus in Säugerzellen vermutete er, daß das konstitutive Heterochromatin derjenige Teil der Zelle sei, in den das Virusgenom integriert würde.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Fibroblastenkultur einer männlichen Erdmaus (Microtus agrestis) wurde hinsichtlich Ploidie, Morphologie der Chromosomen und Heterochromatingehalt untersucht.

1. Im Verlauf der 11-monatigen Kulturzeit ergaben Chromosomenanalysen eine Änderung der Chromosomenzahl; die ursprünglich diploiden Zellen (2n = 50) wurden zunehmend aneuploid. Es fanden sich Zellen im diploiden Bereich mit Chromosomenzahlen um 45, weiterhin Zellen im triploiden und tetraploiden Bereich ohne Bevorzugung einer bestimmten Ploidie.

2. Während der aneuploiden Phase wurden in allen untersuchten Subkulturen morphologisch abweichende Markerchromosomen nachgewiesen. Eines dieser Markerchromosomen wurde als ein deletiertes X-Chromosom identifiziert, ein anderes als Rest des Y-Chromosoms, die übrigen als fusionierte Autosomen.

3. Die für M. agrestis typischen Geschlechtschromosomen waren in den aneuploiden Zellen stark deletiert. Nach Anfärbung des konstitutiven Heterochromatins und durch Nachweis des Spätreplikationsmusters nach ^{3}H-Thymidin-Markierung ergab sich, daß es sich bei dem deletierten Chromosomenmaterial um konstitutivheterochromatische Abschnitte handelte. In normalen, diploiden Zellen beträgt die Länge der konstitutivheterochromatischen Abschnitte auf den Geschlechtschromosomen 13,14 % $\pm$ 3,28 % der Gesamtlänge aller Chromosomen. In aneuploiden Zellen wurde für die aus konstitutivem Heterochromatin bestehenden Chromosomenabschnitte ein Wert von 4,74 % $\pm$ 1,55 %

der Gesamtlänge aller Chromosomen ermittelt. Im Vergleich zur Länge des Heterochromatins in normalen Zellen stellt dieses Ergebnis einen Verlust an konstitutivem Heterochromatin von 64 % dar.

4. Die Gesamtlänge des konstitutiven Heterochromatins in den Centromerregionen der Autosomen zeigte in aneuploiden Zellen keinen signifikanten Unterschied gegenüber diploiden Zellen.

5. In der Diskussion wird ein Überblick über Aufbau und mögliche Funktionen des konstitutiven Heterochromatins gegeben. Weiterhin werden die chromosomalen Veränderungen als Entartungszeichen einer Zelle in Zusammenhang mit dem Heterochromatinverlust gesehen, und es wird die Frage diskutiert, ob der Heterochromatinverlust Ursache oder Folge der Zellentartung sein könnte.

LITERATUR

1. ARRIGHI, F.E., HSU, T.C.:
Localisation of Heterochromatin in human chromosomes.
Cytogenetics 10, 81 (1971)

2. ARRIGHI, F.E., HSU, T.C., SAUNDERS, P., SAUNDERS, G.F.:
Localisation of Repetitive DNA in the Chromosomes of Microtus agrestis.
Chromosoma (Berl.) 32, 234 (1970)

3. BIANCHI, N., LIMA-DE-FARIA, A., JAWORSKA, H.:
A technique for removing silver grains and gelatin from tritium autoradiographs of human chromosomes.
Hereditas (Lund) 51, 207-211 (1964)

4. BRITTEN, R.J., DAVIDSON, E.H.:
Gene regulation for higher cells: a theory.
Science 165, 349-357 (1969)

5. BRITTEN, R.J., KOHNE, D.E.:
Repeated sequences in DNA.
Science 161, 529-540 (1968)

6. BROWN, S.W.:
Heterochromatin.
Science 151, 417-425 (1966)

7. COOPER, K.W.:
Cytogenetic Analysis of Major Heterochromatic Elements (Especially Xh and Y) In Drosophila Melanogaster and the Theory of "Heterochromatin".
Chromosoma (Berl.) 10, 535-588 (1959)

8. COOPER, K.W., HSU, T.C.:
The C-band and G-band patterns of Microtus agrestis chromosomes.
Cytogenetics II, 295-304 (1972)

9. ELLISON, J.R., BARR, H.J.:
Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions, late replication and high A : T content in Samoiaia leonensis.
Chromosoma 36, 375-390 (1972)

10. ENGEL, W., KRONE, W., WOLF, U.:
Die Wirkung von Thioguanin, Hydroxylamin und S-Bromdesoxyuridin auf menschliche Chromosomen in vitro.
Mutation Res (Amsterdam) 4, 353-368 (1967)

11. EVANS, H.J.:
The Surface Topography of G-Banded Human Chromosomes.
In: Symposia Medica Hoechst: Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man
(ed.: R.A. Pfeiffer) Stuttgart-New York, Schattauer
p. 157-161 (1973)

12. GAGNÉ, R., LUCIANI, J.M., DEVICTOR-VUILLET, M., STAHL, A.:
C_9-Heterochromatin during the First Meiotic Prophase of Human Foetal Oocyte.
Exp. Cell. Res. 85, 111-116 (1974)

13. GROPP, A., CITOLER, P., GEISLER, M.:
Karyotypvariation und Heterochromatinmuster bei Igeln (Erinaceus und Hemiechinus).
Chromosoma (Berl.) 27, 288-306 (1969)

14. HARBERS, E., SANDRITTER, W.:
Gesteigerte Heterochromatisierung als pathogenetisches Prinzip.
Dtsch. med. Wschr., 93. Jg., 269-271 (1968)

15. HARBERS, E., SANDRITTER, W.:
Aufbau und Funktion des Chromatins.
Klin. Wschr. 51, 631-643 (1973)

16. HARNDEN, D.G.:
A human skin culture technique used for cytological examinations.
Brit. J. exp. Path. 41, 31 (1960)

17. HEITZ, E.:
Die Herkunft der Chromocentren. Dritter Beitrag zur Kenntnis der Beziehung zwischen Kernstruktur und qualitativer Verschiedenheit der Chromosomen in ihrer Längsrichtung.
Planta 18, 571-637 (1933)

18. HENNIG, W.P., WALKER, M.B.:
Variations in the DNA from two rodent families (Cricetidae and Muridae).
Nature 225, 915 (1970)

19. HSU, T.C.:
Mammalia chromosomes in vitro. IV. Some human neoplasms.
J. Nat. Cancer Inst. 14, 905-933 (1954a)

20. HSU, T.C.:
Cytological studies on HeLa, a strain of human cervical carcinoma. I. Observations on mitosis and chromosomes.
Texas Rep. Biol. Med. 12, 833-846 (1954b)

21. HUANG, C.C.:
Induction of a High Incidence of Damage to the X-Chromosomes of Rattus (Mastomys) natalensis by Base Analogues, Viruses and Carcinogenes.
Chromosoma (Berl.) 23, 162-179 (1967)

22. JONES, K.W.:
Chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells.
Nature 225, 912 (1970)

23. JONES, K.W., ROBERTSON, F.W.:
Localisation of reiterated Nucleotide Sequences in Drosophila and Mouse by in situ Hybridisation of Complementary RNA.
Chromosoma (Berl.) 31, 343 (1970)

24. KINSKY, I., PERA, F.:
Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Interphasechromatin in Epithelzellen verschiedener Nierentubuli.
Verh. Anat. Ges. 67, 483-488 (1973)

25. KOHNE, D.E.:
Evolution of higher organism DNA.
Quart. Rev. Biophys. 3, 327-375 (1970)

26. LAKHOTIA, S.C., JACOB, J.:
EM Autoradiographic Studies on Polytene Nuclei of Drosophila Melanogaster.
(II. Organization and Transcriptive Activity of the Chromocentre).
Exp. Cell. Res. 86, 253-263 (1974)

27. LAMPERT, F.:
Feinstruktur und Trockengewicht menschlicher Chromosomen. Quantitative Elektronenmikroskopie.
Naturwissenschaften 56, 629 (1969)

28. LEJEUNE, J., GAUTIER, M., TURPIN, R.:
Les chromosomes humains en culture de tissues.
C.R. Acad. Sci. (Paris) 248, 602-603 (1959)

29. LEVAN, A. HAUSCHKA, T.S.:
Endomitotic reduplication mechanism in ascites tumors of the mouse.
J. Nat. Cancer Inst. 14, 1-43 (1953)

30. LYON, M.F.:
Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.).
Nature (Lond.) 190, 372 (1961)

31. NATARAJAN, A.T., AHNSTRÖM, G.:
Induced Chromosomal Aberrations and Heterochromatin.
In: Symposia Medica Hoechst: Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man (ed.: R.A. Pfeiffer) Stuttgart - New York: Schattauer p. 215-223 (1973)

32. NATARAJAN, A.T., GROPP, A.:
The Meiotic Behaviour of Autosomal Heterochromatic Segments in Hedgehogs.
Chromosoma (Berl.) 35, 143-152 (1971)

33. NATARAJAN, A.T., GROPP, A.:
A Fluorescence Study of Heterochromatin and Nucleolar Organisation in the Laboratory and Tobacco Mouse.
Exp. Cell Res. 74, 245-250 (1972)

34. NATARAJAN, A.T., SHARMA, R.P.:
Tritiated uridine induced chromosome aberrations in relation to Heterochromatin and nucleolar organization in Microtus agrestis L.
Chromosoma (Berl.) 34, 168-182 (1971)

35. OHNO, S.:
Evolutional Reason for Having so Much Junk DNA.
In: Symposia Medica Hoechst: Modern Aspects of Cytogenetics. Constitutive Heterochromatin in Man (ed.: R.A. Pfeiffer) Stuttgart - New York: Schattauer p. 169-173 (1973)

36. PARDUE, M.L. GALL, J.G.:
Chromosomal Localisation of Mouse Satellite DNA.
Science 168, 1356-1358 (1970)

37. PERA, F.:
Dauer der DNS-Replikation von Eu- und Heterochromatin bei Microtus agrestis.
Chromosoma (Berl.) 25, 21-29 (1968)

38. PERA, F.:
Deletion und Translokation heterochromatischer Chromosomenabschnitte bei Microtus agrestis.
Humangenetik 8, 217-229 (1969)

39. PERA, F.:
Über den Wechsel der Ploidie und das Verhalten heteroploider Zellen.
Habilitationsschrift Bonn 1970

Veröffentlicht unter dem Titel:
Mechanismen der Ploidisierung und der somatischen Reduktion.
Erg. Anat. Entwickl. Gesch. 43/5, 1-112 (1970)

40. PERA, F.:
Pattern of repetitive DNA of the chromosomes of Microtus agrestis.
Chromosoma (Berl.) 36, 263-271 (1972a)

41. PERA, F.:
Heterochromatin, repetitive DNS und Nukleolen in Leberzellen von Microtus agrestis.
Histochemie 30, 82-96 (1972b)

42. PERA. F., FIRSCHING, V., SCHOLZ, P.:
Cytologische und Cytogenetische Untersuchungen über Altersveränderungen in Gewebekulturen.
Verh. Anat. Ges. 69. Versamml. (1974) (in Druck)

43. PERA, F., KINSKY, I.:
Constitutive heterochromatin in interphase nuclei.
In: Symposia Medica Hoechst: Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man (ed.: R.A. Pfeiffer) Stuttgart- New York: Schattauer p. 101-106 (1973)

44. PERA, F., WOLF, U.:
DNS-Replikation und Morphologie der X-Chromosomen während der Syntheseperiode bei Microtus agrestis.
Chromosoma (Berl.) 22, 378-389 (1967)

45. RUTISHAUSER, A.:
Cytogenetik transplantabler tierischer und menschlicher Tumoren.
Neujahrsbl. Naturforsch. Ges., Zürich 165. Stück, 1-85 (1963)

46. SANDRITTER, W.:
Funktionsstrukturen des Zellkerns Eu- und Heterochromatin.
Med. Welt 21, 1-10 (1970)

47. SANDRITTER, W.:
Die Zytophotometrie in der Zytologie.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 57, 42-52 (1973)

48. SANDRITTER, W., HILWEG, I., ENGELHARDT, K., KIEFER, G., KIEFER, R.:
Versuche zur Carcinogenese.
Z. Krebsforsch. 67, 57-68 (1965)

49. SANDRITTER, W., KIEFER, G., KIEFER, R., SAHN, R., MOORE, G.W., GRIMM, H.:
DNA in Heterochromatin Cytophotometric Pattern Recognition Image Analysis among Cell Nuclei in Duct Epithelium and in Carcinoma of the Human Breast.
Beitr. Path. 151, 87-96 (1974)

50. SCHMID, W.:
Heterochromatin in Mammals.
Arch. Klaus-Stift. Vererb. Forsch. 42, 1-60 (1967)

51. SCHMID, W., LEPPERT, M.F.:
Rates of DNA synthesis in heterochromatic and euchromatic segments of the chromosome complements of two rodents.
Cytogenetics 8, 125-135 (1969)

52. SCHMID, W., SMITH, D.W., THEILER, K. (Zürich):
Chromatinmuster in verschiedenen Zelltypen und Lokalisation von Heterochromatin auf Metaphasechromosomen bei Microtus agrestis, Microtus auratus, Cavia cobaya und beim Menschen.
Arch. Klaus-Stift. Vererb. Forsch. 40, 35-49 (1965)

53. SCHNEDL, W.:
Analysis of the human karyotype using a reassociation technique.
Chromosoma 34, 448-454 (1971)

54. SCHNEDL, W.:
Centromeric Heterochromatin in Cattle.
In: Symposia Medica Hoechst: Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man (ed.: R.A. Pfeiffer) Stuttgart - New York: Schattauer p. 107-111 (1973)

55. SCHNEIDER, G., WALDENMAIER, C.:
Verteilung strahleninduzierter Brüche auf den Geschlechtschromosomen von Microtus agrestis.
Humangenetik 8, 230-241 (1969)

56. SCHRADER, F.:
Experimental and cytological investigations of life-cycle of Grossyparia spuria (Coccidae) and their bearing on problem of haploidy in males.
Ztschr. f. wissensch. Zool. 134, 149-179 (1929)

57. SCHWARZACHER, H.G.:
Altern der Zellen in Gewebekulturen.
Verh. Anat. Ges. 69. Versamml. (1974)

58. SETH, P.K., GROPP, A.:
Study of Constitutive Heterochromatin with a new and simplified fluorescence staining technique.
Genetica 44, 485-495 (1973)

59. SIEGER, M., PERA, F., SCHWARZACHER, H.G.:
Genetic inactivity of heterochromatin and heteropycnosis in Microtus agrestis.
Chromosoma 29, 349-364 (1970)

60. SOUTHERN, E.M.:
Base sequence and evolution of guinea-pig α -Satellite DNA.
Nature (Lond.) 227, 794-798 (1970)

61. SOUTHERN, E.M.:
Effects of Sequence Divergence on the Reassociation Properties of Repetitive DNAs.
Nature (New Biol.) 232, 82-83 (1971)

62. SUTTON, W.D., Mc CALLUM, M.:
Related satellite DNA's in the genus Mus.
J. molec. Biol. 71, 633 (1972)

63. SWANSON, C.P.:
Cytologie und Cytogenetik.
Stuttgart: Fischer (1960)

64. SWARTZ, M.N., TRAUTNER, T.A., KORNBERG, A.:
Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid.
XI Further studies on nearest neighbor base sequences in deoxyribonucleic acids.
J. Biol. Chem. 237, 1961-1967 (1962)

65. WEISBLUM, B., De HASETH, P.L.:
Quinacrine, a chromosome stain specific for deoxyadenylate-deoxythymidylate rich regions in DNA.
Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 629-632 (1972)

66. WOLF, U., FLINSPACH, G., BÖHM, R., OHNO, S.:
DNS-Replikationsmuster bei den Riesen-Geschlechtschromosomen von Microtus Agrestis.
Chromosoma (Berl.) 16, 609-617 (1965)

67. YASMINEH, W.G., YUNIS, J.J.:
Satellite DNA in the mouse autosomal heterochromatin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 779-782 (1969)

68. YASMINEH, W.G., YUNIS, J.J.:
Repetitive DNA of Microtus agrestis.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 580-587 (1971)

69. YUNIS, J.J.:
Constitutive Heterochromatin and the Repeated DNA Sequences of Mammals.
In: Symposia Medica Hoechst: Modern Aspects of Cytogeneties: Constitutive Heterochromatin in Man (ed.: R.A. Pfeiffer) Stuttgart - New York: Schattauer p. 5-17 (1973)

70. YUNIS, J.J., ROLDAN, L., YASMINEH, W.G., LEE, J.C.: Staining of repetitive DNA in metaphase chromosomes. Nature (Lond.) 231, 532-533 (1971)

DANKSAGUNG
==========

An dieser Stelle möchte ich vor allem Herrn Prof. Dr. F. Pera, Anatomisches Institut Bonn, herzlich für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung danken.

Herr Professor Dr. H.G. Schwarzacher, Histologisch-Embryologisches Institut der Universität Wien, stellte freundlicherweise die Kultur zur Verfügung. Ihm und Fräulein P. Scholz, die mir bei der technischen Ausführung meiner Versuche behilflich war, gilt ebenfalls mein besonderer Dank.

LEBENSLAUF

Am 27.8.1948 wurde ich, Verena Firsching, als Tochter des Arztes Dr. Hanns-Werner Firsching und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Dietrich, in Bochum geboren.

Von 1955 bis 1968 besuchte ich die Liborius-Volksschule in Bochum, das Hildegardis-Gymnasium in Bochum und das neusprachliche Mädchengymnasium in Wipperfürth, wo ich im Mai 1968 die Reifeprüfung bestand.

Nach einem Semester Naturwissenschaften in Marburg begann ich im WS 69/70 Psychologie an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn zu studieren. Im SS 70 immatrikulierte ich mich dort für Medizin. Im Frühjahr 1971 bestand ich das Vorphysikum, im Herbst 1972 das Physikum. Seit dem 4. klinischen Semester studiere ich an der Medizinischen Hochschule Lübeck, wo ich nach dem SS 75 das Medizinische Staatsexamen ablegen möchte.